

Isoliertes Photoprotein Bolinopsin, sowie dessen Verwendung

Die Erfindung betrifft das Photoprotein Bolinopsin, dessen Nukleotid- und Aminosäuresequenz, sowie die Aktivität und Verwendung des Photoproteins Bolinopsin.

**Photoproteine**

- 5 Als Biolumineszenz bezeichnet man das Phänomen der Lichterzeugung durch Lebewesen. Sie ist das Ergebnis von biochemischen Reaktionen in Zellen, bei denen die chemische Energie in Form von Lichtquanten abgegeben wird (sog. kalte Emission durch Chemolumineszenz). Derartig erzeugtes Licht ist monochromatisch, denn es wird bei einem diskreten Elektronen-Übergang abgestrahlt, kann aber durch sekundäre Leuchtfarbstoffe (z.B. fluoreszierende Proteine bei Leucht-
- 10 quallen der Gattung Aequora) in längerwellige Spektralbereiche verschoben werden.

- Die biologische Funktion ist vielfältig: In der Meerestiefe zwischen 200 und 1000 m (Mesopelagial) leuchten rund 90% aller Lebewesen. Die Leuchtsignale werden hier zur Partnerwerbung, Täuschung und als Köder eingesetzt. Auch Glühwürmchen und Leuchtkäfer nutzen die Lichtsignale zur Partnersuche. Die Bedeutung des Leuchtens von Bakterien, Pilzen und einzelligen
- 15 Algen ist dagegen unklar. Es wird vermutet, dass es zur Koordination von vielen Einzel-Individuen einer großen Population eingesetzt wird oder eine Art biologische Uhr darstellt.

- Eine Vielzahl an Coelenteraten ist biolumineszent (Morin et al., 1974). Diese Organismen emittieren blaues oder grünes Licht. Das 1962 als erstes Licht produzierendes Protein identifizierte Aequorin aus Aequoria victoria (Shimomura et al., 1969) emittierte als isoliertes Protein ein blaues
- 20 Licht und nicht grünes Licht wie phänotypisch beobachtet bei Aequoria victoria. Später konnte das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus Aequoria victoria isoliert werden, das aufgrund der Anregung durch das Aequorin die Meduse phänotypisch grün erscheinen lässt (Johnson et al, 1962; Hastings et al., 1969; Inouye et al, 1994). Als weitere Photoproteine konnten noch Clytin (Inouye et al., 1993), Mitrocomin (Fagan et al., 1993) und Obelin (Illarionov et al., 1995)
- 25 identifiziert und beschrieben werden.

**Tabelle 1:** Übersicht über einige Photoproteine. Angegeben ist der Name, der Organismus aus dem das Protein isoliert worden ist und die Identifikationsnummer (Acc. No.) des Datenbankeintrages.

Name	Organismus	Identifikations Nr.
Obelin	Obelia geniculata	AAL86372
Clytin	Clytia gregaria	CAA49754
Aequorin	Aequorea macrodactyla	AAK02061
Aequorin	Aequorea parva	AAK02060
Mitrocomin	Mitrocoma cellularia	AAA29298
Pholasin	Pholas dactylus	AAM18085
?	Symplectoteuthis oualaniensis	AX305029

5 **Tabelle 2:** Übersicht über einige Photoproteine. Angegeben ist der Organismus aus dem das Protein isoliert worden ist, der Name des Photoproteins und eine Auswahl an Patenten bzw. Anmeldungen.

Organismus	Fluoreszierendes Protein	Patent / Anmeldung
Obelia geniculata	Obelin	WO03006497
Aequoria victoria	Aequorin	WO200168824 US-0908909 US 6,152,358 JP-0176125
Pholas dactylus	Pholasin	WO0028025 GB-0024357

10 Biolumineszenz wird heute in der Technik vielfältig genutzt, z.B. in Form von Bio-Indikatoren für Umweltverschmutzung oder in der Biochemie zum empfindlichen Nachweis von Proteinen, zur Quantifizierung bestimmter Verbindungen oder als sogenannte "Reporter" bei der Untersuchung zellulärer Gen-Regulation.

Die Photoproteine unterscheiden sich nicht nur aufgrund ihrer Nukleotid- und Aminosäuresequenz, sondern auch aufgrund ihrer biochemischen und physikalischen Eigenschaften.

15 Es konnte gezeigt werden, dass durch die Veränderung der Aminosäuresequenz von Photoproteinen die physikalischen und biochemischen Eigenschaften verändert werden können.

Beispiele von mutagenisierten Photoproteinen sind in der Literatur beschrieben (US 6,495,355; US 5,541,309; US 5,093,240; Shimomura et al., 1986).

Die Lichterzeugung durch die oben genannten Photoproteine erfolgt durch die Oxidation von Coelenterazin (Haddock et al., 2001; Jones et al., 1999).

## 5 Reportersysteme

Als Reporter- oder Indikatorgen bezeichnet man generell Gene, deren Genprodukte sich mit Hilfe einfacher biochemischer oder histochemischer Methoden leicht nachweisen lassen. Man unterscheidet mindestens 2 Typen von Reportergenen.

1. Resistenzgene. Als Resistenzgene werden Gene bezeichnet, deren Expression einer Zelle die Resistenz gegen Antibiotika oder andere Substanzen verleiht, deren Anwesenheit im Wachstumsmedium zum Zelltod führt, wenn das Resistenzgen fehlt.
2. Reportergene. Die Produkte von Reportergenen werden in der Gentechnologie als fusionierte oder unfusionierte Indikatoren verwendet. Zu den gebräuchlichsten Reportergenen gehört die beta-Galaktosidase (Alam et al., 1990), alkalische Phosphatase (Yang et al., 1997; Cullen et al., 1992), Luciferasen und andere Photoproteine (Shinomura, 1985; Phillips GN, 1997; Snowdowne et al., 1984).

Als Lumineszenz bezeichnet man die Abstrahlung von Photonen im sichtbaren Spektralbereich, wobei diese durch angeregte Emittiermoleküle erfolgt. Im Unterschied zur Fluoreszenz wird hierbei die Energie nicht von Außen in Form von Strahlung kürzerer Wellenlänge zugeführt.

- Man unterscheidet Chemilumineszenz und Biolumineszenz. Als Chemolumineszenz bezeichnet man eine chemische Reaktion die zu einem angeregten Molekül führt, das selbst leuchtet, wenn die angeregten Elektronen in den Grundzustand zurückkehren. Wird diese Reaktion durch ein Enzym katalysiert, spricht man von Biolumineszenz. Die an der Reaktion beteiligten Enzyme werden generell als Luziferasen bezeichnet.

## 25 Einordnung der Spezies *Bolinopsis infundibulum*

Eumetazoa → Radiata → Ctenophora → Tentaculata → Lobata → Bolinopsidae → *Bolinopsis infundibulum*

### Isolierung der cDNA

Zur Untersuchung der Biolumineszenz-Aktivität der Spezies *Bolinopsis infundibulum* wurden Exemplare im Weißen Meer (Biologische Station Kartesh, Russland) gefangen und in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Erstellung der cDNA-Bibliotheken von *Bolinopsis infundibulum*, wurde  
 5 die poly(a)+ RNA mit Hilfe des „Straight A“ Isolationsmethode von Novagen (USA) isoliert.

Zur Herstellung der cDNA wurde eine RT-PCR durchgeführt. Hierzu wurden 1 µg RNA mit Reverser Transkriptase (Superscript Gold II) nach folgendem Schema inkubiert:

10	PCR	1.	30	Sekunden	95°C
		2.	6	Minuten	68°C
		3.	10	Sekunden	95°C
		4.	6	Minuten	68°C

17 Zyklen von Schritt 4 nach Schritt 3

Die Reaktionsprodukte wurden zur Inaktivierung der Polymerase für 30 Minuten bei 37°C mit Proteinase K inkubiert und die cDNA mit Ethanol präzipitiert. Die Expression-cDNA Bank wurde  
 15 mit Hilfe des „SMART cDNA Library Construction Kits“ der Firma Clontech (USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Klonierung erfolgte in den Expressionsvektor pTriplEx2 (Clontech; USA). Die Expressionsvektoren wurden durch Elektroporation in Bakterien des Stammes *E. coli* XL1-Blue transformiert.

Die Bakterien wurden auf LB-Nährböden plattiert und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. An-  
 20 schließend wurde eine Replikaplattierung durchgeführt, indem die Bakterien mit Hilfe eines Nitrocellulosefilters auf eine weitere Nährbodenplatte übertragen wurde. Die Replikaplatte wurde wiederum für 24 Stunden bei 37°C inkubiert und die gewachsenen Bakterienkolonien in LB-Flüssigmedium übertragen. Nach der Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,1 mM) wurden die Bakterien für 4 Stunden bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden durch  
 25 Zentrifugation geerntet und die Bakterienmasse in 0,5 ml Aufschlusspuffer (5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCL pH 9,0) bei 0°C resuspendiert. Anschließend erfolgte der Aufschluss der Bakterien durch Ultraschall.

Die Lysate wurden nach der Zugabe von Coelenterazine (Endkonzentration 10E-07 M) bei 4°C für 3 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Biolumineszenz nach der Zugabe von  
 30 Calciumchlorid (Endkonzentration 20 mM) im Luminometer.

Es wurde ein Photoprotein identifiziert. Das Photoprotein wurde als Bolinopsin bezeichnet. Im Folgenden wird das Photoprotein Bolinopsin im einzelnen dargestellt.

## Bolinopsin

Das Photoprotein Bolinopsin zeigt die höchste Homologie auf Aminosäureebene zu Aequorin aus *Aequoria victoria* mit einer Identität von 44 % (gezeigt in Beispiel 8; Fig. 7). Auf Nukleinsäureebene liegt die Identität unter 30 % (gezeigt in Beispiel 9; Fig. 6). Zum Sequenzvergleich wurde das BLAST-Verfahren verwendet (Altschul et al., 1997).

Die Erfindung betrifft auch funktionelle Äquivalente von Bolinopsin. Funktionelle Äquivalente sind solche Proteine, die vergleichbare physikochemische Eigenschaften haben und mindestens 70 % homolog sind zu SEQ ID NO: 2. Bevorzugt ist eine Homologie von mindestens 80 % oder 90 %. Besonders bevorzugt ist eine Homologie von mindestens 95 %.

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Reportergen für zelluläre Systeme speziell für Rezeptoren, für Ionenkanäle, für Transporter, für Transkriptionsfaktoren oder für induzierbare Systeme.

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Reportergen in bakteriellen und eukaryotischen Systemen speziell in Säugerzellen, in Bakterien, in Hefen, in Bakulo, in Pflanzen.

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Reportergene für zelluläre Systeme in Kombination mit biolumineszenten oder chemolumineszenten Systemen speziell Systemen mit Luziferasen, mit Oxygenasen, mit Phosphatasen.

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Fusionsprotein speziell für Rezeptoren, für Ionenkanäle, für Transporter, für Transkriptionsfaktoren, für Proteinasen, für Kinasen, für Phosphodiesterasen, für Hydrolasen, für Peptidasen, für Transferasen, für Membranproteine, für Glykoproteine.

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich zur Immobilisierung speziell durch Antikörper, durch Biotin, durch magnetische oder magnetisierbare Träger.

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Protein für Systeme des Energietransfers speziell der FRET- (Fluorescence Resonance Energy Transfer), BRET- (Bioluminescence Resonance Energy Transfer), FET (field effect transistors), FP (fluorescence polarization), HTRF (Homogeneous time-resolved fluorescence) Systemen.

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Markierung von Substraten oder Liganden speziell für Proteasen, für Kinasen, für Transferasen.

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich zur Expression in bakteriellen Systemen speziell zur Titerbestimmung, als Substrat für biochemische Systeme speziell für Proteinasen und Kinasen.

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Marker speziell gekoppelt an Antikörper, gekoppelt an Enzyme, gekoppelt an Rezeptoren, gekoppelt an Ionenkanäle und andere Proteine.

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Reportergen bei der pharmakologischen Wirkstoffsuche speziell im HTS (High Throughput Screening).

- 5 Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Komponente von Detektionssystemen speziell für ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), für Immunohistochemie, für Western-Blot, für die konfokale Mikroskopie.

- Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Marker für die Analyse von Wechselwirkungen speziell für Protein-Protein-Wechselwirkungen, für DNA-Protein-Wechselwirkungen, für DNA-  
10 RNA-Wechselwirkungen, für RNA-RNA- Wechselwirkungen, für RNA-Protein-Wechselwirkungen (DNA : deoxyribonucleic acid; RNA : ribonucleic acid; ).

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Marker oder Fusionsprotein für die Expression in transgenen Organismen speziell in Mäusen, in Ratten, in Hamstern und anderen Säugetieren, in Primaten, in Fischen, in Würmern, in Pflanzen.

- 15 Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Marker oder Fusionsprotein zur Analyse der Embryonalentwicklung.

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Marker über einen Kopplungsvermittler speziell über Biotin, über NHS (N-hydroxysulfosuccimide), über CN-Br.

- Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Reporter gekoppelt an Nukleinsäuren speziell an  
20 DNA, an RNA.

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Reporter gekoppelt an Proteine oder Peptide.

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Reporter zur Messung von intra- oder extrazellulären Calciumkonzentrationen.

- Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich zur Charakterisierung von Signalkaskaden in zellulären  
25 Systemen.

Das an Nukleinsäuren oder Peptiden gekoppelte Photoprotein Bolinopsin eignet sich als Sonde speziell für Northern-Blots, für Southern-Blots, für Western-Blots, für ELISA, für Nukleinsäuresequenzierungen, für Proteinanalysen, Chip-Analysen.

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich Markierung von pharmakologischen Formulierungen speziell von infektiösen Agentien, von Antikörpern, von „small molecules“.

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich für geologische Untersuchungen speziell für Meeres-, Grundwasser- und Flussströmungen.

- 5 Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich zur Expression in Expressionssystemen speziell in in-vitro Translationssystemen, in bakteriellen Systemen, in Hefe Systemen, in Bakulo Systemen, in viralen Systemen, in eukaryotischen Systemen.

Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich zur Visualisierung von Geweben oder Zellen bei chirurgischen Eingriffen speziell bei invasiven, bei nicht-invasiven, bei minimal-invasiven.

- 10 Das Photoprotein Bolinopsin eignet sich auch zur Markierung von Tumorgeweben und anderen phänotypisch veränderten Geweben speziell bei der histologischen Untersuchung, bei operativen Eingriffen.

Die Erfindung betrifft auch die Reinigung des Photoprotein Bolinopsin speziell als wildtyp Protein, als Fusionsprotein, als mutagenisiertes Protein.

- 15 Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Photoprotein Bolinopsin auf dem Gebiet der Kosmetik speziell von Badezusätzen, von Lotionen, von Seifen, von Körperfarben, von Zahncreme, von Körperpudern.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Photoprotein Bolinopsin zur Färbung speziell von Nahrungsmitteln, von Badezusätzen, von Tinte, von Textilien, von Kunststoffen.

- 20 Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Photoprotein Bolinopsin zur Färbung von Papier speziell von Grußkarten, von Papierprodukten, von Tapeten, von Bastelartikeln.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Photoprotein Bolinopsin zur Färbung von Flüssigkeiten speziell für Wasserpistolen, für Springbrunnen, für Getränke, für Eis.

- 25 Die Erfindung betrifft auch die Verwendung des Photoprotein Bolinopsin zur Herstellung von Spielwaren speziell von Fingerfarbe, von Schminke.

Die Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle, die das Polypeptid offenbart durch SEQ ID NO: 2 kodieren.

Die Erfindung betrifft das Polypeptid mit der Aminosäuresequenz, die in SEQ ID NO: 2 offenbart ist.

Die Erfindung bezieht sich des weiteren auf Nukleinsäuremoleküle, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- a) Nukleinsäuremolekülen, die ein Polypeptid kodieren, welches die Aminosäuresequenz offenbart durch SEQ ID NO: 2 umfasst;
- 5 b) Nukleinsäuremolekülen, welche die durch SEQ ID NO: 1 dargestellte Sequenz enthalten;
- c) Nukleinsäuremolekülen, deren komplementärer Strang mit einem Nukleinsäuremolekül aus a) oder b) unter stringenten Bedingungen hybridisiert und welche die biologische Funktion eines Photoproteins aufweisen;
- 10 d) Nukleinsäuremolekülen, welche sich auf Grund der Degenerierung des genetischen Kodes von den unter c) genannten unterscheiden;
- e) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 95 % zu SEQ ID NO: 1 zeigen, und deren Proteinprodukt die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist; und
- 15 f) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 65 % zu SEQ ID NO: 1 zeigen, und deren Proteinprodukt die biologische Funktion eines Photoproteins aufweist.

Die Erfindung betrifft auch Nukleinsäuremoleküle, die eine Sequenzhomologie von mindestens 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 %, 65 % oder 60 % zu SEQ ID NO: 1 aufweisen und für ein Polypeptid kodieren, welches die Eigenschaften eines Photoproteins besitzt.

- 20 Die Erfindung betrifft die oben genannten Nukleinsäuremoleküle, bei denen die Sequenz einen funktionalen Promotor 5' zu der das Photoprotein kodierenden Sequenz enthält.

Die Erfindung betrifft auch Nukleinsäuremoleküle wie vorbergehend beschrieben, die Bestandteil von rekombinanten DNA oder RNA Vektoren sind.

Die Erfindung betrifft Organismen, die einen solchen Vektor enthalten.

- 25 Die Erfindung bezieht sich auf Oligonukleotide mit mehr als 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, die identisch oder komplementär zur DNA oder RNA Sequenz der Bolinopsin Moleküle oder der weiteren erfindungsgemäßen Molekülen sind.

Die Erfindung betrifft Photoproteine, die durch die vorbergehend beschriebenen Nukleotidsequenzen kodiert sind.

Die Erfindung bezieht sich auf Verfahren zur Expression der erfindungsgemäßen Photoprotein Polypeptide in Bakterien, eukaryontischen Zellen oder in *in vitro* Expressionssystemen.

Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur Aufreinigung/Isolierung eines erfindungsgemäßen Photoprotein Polypeptides.

- 5 Die Erfindung bezieht sich auf Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die immunologisch durch Antikörper gegen die erfindungsgemäßen Photoproteine erkannt werden.

Die Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen, für Photoproteine kodierende Nukleinsäuren als Marker- oder Reportergene, insbesondere für die pharmakologische Wirkstoffsuche und Diagnostik.

- 10 Die Erfindung betrifft die Verwendung der erfindungsgemäßen Photoproteine bzw. eine erfindungsgemäße, für ein Photoprotein kodierende Nukleinsäure als Marker oder Reporter bzw. als Marker- oder Reportergen.

- Die Erfindung betrifft die Verwendung des Photoproteins Bolinopsin (SEQ ID NO: 2) bzw. die Verwendung einer für das Photoprotein Bolinopsin kodierenden Nukleinsäure als Marker oder  
15 Reporter bzw. als Marker oder Reportergen insbesondere für die pharmakologische Wirkstoffsuche und Diagnostik.

Die Erfindung betrifft die Verwendung der in SEQ ID NO: 1 dargestellten Nukleinsäure als Marker- oder Reportergen, insbesondere für die pharmakologische Wirkstoffsuche und Diagnostik.

- Gegenstand der Erfindung sind auch polyklonale oder monoklonale Antikörper, welche ein erfindungsgemäßes Polypeptid erkennen.  
20

Die Erfindung betrifft auch monoklonale oder polyklonale Antikörper, die das Photoprotein Bolinopsin (SEQ ID NO: 2) erkennen.

### Expression der erfindungsgemäßen Photoproteine

- Als Expression bezeichnet man die Produktion eines Moleküls, das nach dem Einbringen des Gens  
25 in eine geeignete Wirtszelle die Transcription und Translation des in einen Expressionsvektor klonierte Fremdgen erlaubt. Expressionsvektoren enthalten die für die Expression von Genen in Zellen von Prokaryoten oder Eukaryoten erforderlichen Kontrollsignale.

Expressionsvektoren können prinzipiell auf zwei verschiedene Weisen konstruiert werden. Bei den sogenannten Transcriptionsfusionen wird das vom einklonierten Fremdgen codierte Protein als

authentisches, biologisch aktives Protein synthetisiert. Der Expressionsvektor trägt hierzu alle zur Expression benötigten 5'- und 3'- Kontrollsignale.

Bei den sogenannten Translationsfusionen wird das vom einklonierten Fremdgen codierte Protein als Hybridprotein zusammen mit einem anderen Protein exprimiert, das sich leicht nachweisen lässt. Die zur Expression benötigten 5'- und 3'- Kontrollsignale inklusive des Startcodons und eventuell ein Teil der für die N-terminalen Bereiche des zu bildenden Hybridproteins codierenden Sequenzen stammen vom Vektor. Der zusätzliche eingeführte Proteinteil stabilisiert nicht nur in vielen Fällen das vom einklonierten Fremdgen codierte Protein vor dem Abbau durch zelluläre Proteasen, sondern lässt sich auch zum Nachweis und zur Isolierung des gebildeten Hybridproteins einsetzen. Die Expression kann sowohl transient, als auch stabil erfolgen. Als Wirtsorganismen eignen sich sowohl Bakterien, Hefen, Viren als auch eukaryotische Systeme.

### **Reinigung der erfindungsgemäßen Photoproteine**

Die Isolierung von Proteinen (auch nach Überexpression) wird häufig als Proteinreinigung bezeichnet. Zur Proteinreinigung steht eine Vielzahl an etablierten Methoden und Verfahren zur Verfügung.

Die Fest-Flüssig-Trennung ist eine Grundoperation bei Proteinisolierungen. Sowohl bei der Abtrennung der Zellen vom Kulturmedium als auch bei der Klärung des Rohextraktes nach Zellaufschluss und Entfernung der Zelltrümmer, bei der Abtrennung von Niederschlägen nach Fällungen usw. ist der Verfahrensschritt erforderlich. Er erfolgt durch Zentrifugation und Filtration.

Durch Gewinnung intrazellulärer Proteine muss die Zellwand zerstört bzw. durchlässig gemacht werden. Je nach Maßstab und Organismus werden dazu Hochdruckhomogenisatoren oder Rührwerkskugel- bzw. Glasperlenmühlen eingesetzt. Im Labormaßstab kommen u.a. mechanische Zellintegrationen und Ultraschallbehandlung zum Einsatz.

Sowohl für extrazelluläre als auch intrazelluläre Proteine (nach Zellaufschluss) sind verschiedene Fällungsverfahren mit Salzen (insbesondere Ammoniumsulfat) oder organischen Lösungsmitteln (Alkohole, Aceton) eine schnelle und effiziente Methode zur Konzentration von Proteinen. Bei der Reinigung intrazellulärer Proteine ist die Entfernung der löslichen Nukleinsäuren erstrebenswert (Fällung z.B. mit Streptomycin- oder Protaminsulfat). Bei der Gewinnung extrazellulärer Proteine werden häufig Träger (z.B. Stärke, Kieselgur) vor Zugabe der Fällungsmittel zugesetzt, um besser handhabbare Niederschläge zu erhalten.

Für die Feinreinigung stehen zahlreiche chromatographische und Verteilungsverfahren zur Verfügung (Absorptions- und Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltration, Affinitätschromatographie, Elektrophoresen). Eine Säulenchromatographie wird auch im technischen Maßstab angewandt. Für den Labormaßstab ist vor allem die Affinitätschromatographie von Bedeutung, die  
 5 Reinigungsfaktoren bis zu mehreren 100 pro Schritt ermöglicht.

Extrazelluläre Proteine fallen in relativ verdünnten Lösungen an. Sie müssen ebenso wie extrazelluläre Proteine vor ihrer weiteren Verwendung konzentriert werden. Neben den schon erwähnten Verfahren hat sich – auch im industriellen Maßstab – die Ultrafiltration bewährt.

Anorganische Salze als Begleitstoffe von Proteinen sind für spezifische Anwendungen häufig  
 10 unerwünscht. Sie können u.a. durch Gelfiltration, Dialyse und Diafiltration entfernt werden.

Zahlreiche Proteine kommen als Trockenpräparate zum Einsatz. Als Trocknungsverfahren sind die Vakuum-, Gefrier- und Sprühtrocknung von Bedeutung.

#### Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

Das Photoprotein Bolinopsin wird durch die folgende Nukleotidsequenz kodiert (SEQ ID NO: 1):

15 5'-  
 ATGCCTCTAGACGAGACCAACAACGAAAGCTATAGATGGCTGAGAAGTGTGGGTAAC  
 GATTGGCAGTTTGATGTCGAGGACGTTTCATCCTAAACAGCTTAGTCGGCTCTACAAGA  
 GATTCGACACCTTCGATCTAGACAGTGACGGTCGTATGGACATGGACGAGATCCTGTA  
 CTGGCCCGACAGAATGAGGCAGCTGGTGAACGCTTCTGACGAACAGGTCGAGAAGAT  
 20 GAGGGCTGCTTGCTACACCTTCTTCCACAACAAAGGAGTGGATCCAGAAAAGGGACTC  
 CTCAGAGACGACTGGGTTGAGGCTAACAGAGTATTTGCTGAGGCTGAAAGAGAGAGG  
 GAACGACGTGGCATGCCCTCCTTGATTGGTCTTTTGTGACACGCTTACTACGATGTCCT  
 GGATGATGACGGTGATGGTACTGTTGATGTTGATGAACTCAAACCATGATGAAGGCT  
 TTTGATGTGCCCCAGGAGGCTGCCTACACCTTCTTTAAGAAA GCTGACACGGATAATA  
 25 GTGGAAACTGGAGAGAAGCGAACTGGTCCATCTCTTCAGAAAGTTCTGGATGGAATC  
 CTACGATCCTCAGTGGGACGGTGTCTACGCTTACAAATATTAA-3'.

Daraus ergibt sich eine Aminosäuresequenz von (SEQ ID NO: 2):

MPLDETNNESYRWLRVSGNDWQFDVEDVHPKQLSRLYKRFDTFDLSDGRMDMDEILY  
 WPDRMRQLVNASDEQVEKMRAACYTFFHNKGVDPEKGLLRDIDWVEANRVFAEAERERE  
 30 RRGMPSLIGLLSDAYYDVLDDDDGDTVDVDELKTMMKAFDVPQEAAYTFFKKADTDNS  
 GKLERSELVHLFRKFWMESYDPQWDGVYAYKY

Diese Sequenzen finden sich im Sequenzlisting wieder.

### Kurze Beschreibung der Figuren

Fig. 1: Die Fig. 1 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pTriplex2-Bolinopsin.

Fig. 2: Die Fig. 2 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pcDNA3-Bolinopsin

5 Fig. 3: Die Fig. 3 zeigt die Excitation von Bolinopsin. Y : Intensität; X : Wellenlänge [nm].

Fig. 4: Die Fig. 4 zeigt die Fluoreszenz von Bolinopsin. Y : Intensität; X : Wellenlänge [nm].

Fig. 5: Die Fig. 5 zeigt die Biolumineszenz von Bolinopsin. Y : Intensität; X : Wellenlänge [nm].

Fig. 6: Die Fig. 6 zeigt das Alignment von Bolinopsin und Aequorin (*aequoria victoria*) auf Nukleinsäureebene.

10 Fig. 7: Die Fig. 7 zeigt das Alignment von Bolinopsin und Aequorin (*aequoria victoria*) auf Aminosäureebene.

Fig. 8: Die Fig. 8 zeigt das Ergebnis der Biolumineszenzmessung von Bolinopsin nach bakterieller Expression. Y : Lumineszenz in RLU [relative light units]; X :  $\mu$ l Lysat : 0 = uninduziertes Kontrolllysat.

15 Fig. 9: Die Fig. 9 zeigt das Ergebnis der Biolumineszenzmessung von Bolinopsin nach bakterieller Expression in Abhängigkeit vom eingesetzten Coelenterazinderivat. Y : Lumineszenz in RLU [relative light units]; X : Coelenterazinderivat : 1 = nativ, 2 = cp, 3 = f, 4 = fcp, 5 = hcp, 6 = h, 7 = i, 8 = ip, 9 = n; Balken : schwarz : uninduziertes Kontrolllysat; hell-grau : 10  $\mu$ l Lysat; weiss : 20  $\mu$ l Lysat; dunkel-grau : 40  $\mu$ l Lysat.

## Beispiele

### Beispiel 1

Als Vektor zur Herstellung des im folgenden dargestellten Konstruktes wurde das Plasmid pTriplEx2 der Firma Clontech verwendet. Das Derivat des Vektors wurde als pTriplEx2-Bolinopsin bezeichnet. Der Vektor pTriplEx2-Bolinopsin wurde zur Expression von Bolinopsin in bakteriellen Systemen verwendet.

Die Fig. 1 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pTriplEX2-Bolinopsin .

### Beispiel 2

Als Vektor zur Herstellung des im folgenden dargestellten Konstruktes wurde das Plasmid pcDNA3.1(+) der Firma Clontech verwendet. Das Derivat des Vektors wurde als pcDNA3-Bolinopsin bezeichnet. Der Vektor pcDNA3-Bolinopsin wurde zur Expression von Bolinopsin in eukaryotischen Systemen verwendet.

Die Fig. 2 zeigt die Plasmidkarte des Vektors pcDNA3-Bolinopsin .

### Beispiel 3

#### **15 Bakterielle Expression**

Die bakterielle Expression erfolgte im E. coli Stamm BL21(DE3) durch Transformation der Bakterien mit den Expressionsplasmiden pTriplEX2-Bolinopsin und pTriplEX2. Die transformierten Bakterien wurden in LB-Medium bei 37°C für 3 Stunden inkubiert und die Expression für 4 Stunden durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die induzierten Bakterien wurden durch Zentrifugation geerntet, in PBS + 5 mM EDTA resuspendiert und durch Ultraschall aufgeschlossen. Das Lysat wurde 3 Stunden mit Coelenterazin im dunkeln inkubiert. Direkt nach der Zugabe von 5 mM Calciumchlorid wurde die Biolumineszenz im Luminometer gemessen. Die Integrationszeit der Messung betrug 40 Sekunden.

Die Fig. 8 zeigt die Ergebnisse der Biolumineszenzmessung von Bolinopsin.

#### **25 Beispiel 4**

#### **Eukaryotische Expression**

Die konstitutive eukaryotische Expression erfolgte in CHO-Zellen durch Transfektion der Zellen mit den Expressionsplasmiden pcDNA3-Bolinopsin und pcDNA3.1(+) in transienten Experi-

menten. Hierzu wurden 10000 Zellen pro Loch in DMEM-F12 Medium auf 96 Loch Mikrotiterplatten plattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe des Fugene 6 Kits (Roche) nach Herstellerangaben. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht bei 37°C in DMEM-F12 Medium inkubiert.

## 5 Beispiel 5

BLAST

Ergebnis einer BLAST-Analyse von Bolinopsin auf der Aminosäureebene.

>pdb|1JF2|A Chain A, Crystal Structure Of W92f Obelin Mutant From Obelia Longissima At 1.72 Angstrom Resolution, Length = 195, Score = 85.1 bits (209), Expect = 8e-16, Identities = 52/177 (29%), Positives = 90/177 (50%), Gaps = 4/177 (2%)

>emb|CAD87698.1| unnamed protein product [synthetic construct], Length = 195, Score = 81.6 bits (200), Expect = 8e-15, Identities = 51/177 (28%), Positives = 89/177 (49%), Gaps = 4/177 (2%)

>pdb|1JF0|A Chain A, The Crystal Structure Of Obelin From Obelia Geniculata At 1.82 A Resolution, gb|AAL86372.1|AF394688\_1 apoobelin [Obelia geniculata], Length = 195, Score = 80.1 bits (196), Expect = 2e-14, Identities = 51/177 (28%), Positives = 89/177 (49%), Gaps = 4/177 (2%)

>sp|P39047|MYTR\_MITCE Mitrocomin precursor, pir|S39022 mitrocomin precursor - Mitrocoma cellularia, gb|AAA29298.1| apomitrocomin, Length = 198, Score = 78.6 bits (192), Expect = 7e-14, Identities = 47/177 (26%), Positives = 91/177 (50%), Gaps = 4/177 (2%)

>sp|Q08121|CLYT\_CLYGR Clytin precursor (Phialidin), pir|S28860 clytin - hydromedusa (Clytia gregarium), emb|CAA49754.1| clytin [Clytia gregaria], gb|AAA28293.1| apoclytin, Length = 198, Score = 77.4 bits (189), Expect = 2e-13, Identities = 53/177 (29%), Positives = 89/177 (49%), Gaps = 4/177 (2%)

## 25 Beispiel 6

BLAST

Ergebnis einer BLAST-Analyse von Bolinopsin auf Nukleinsäureebene.

>gb|AC073341.10| Homo sapiens BAC clone RP11-549I23 from 7, complete sequence, Length = 185574, Score = 52.6 bits (27), Expect = 4e-04, Identities = 33/36 (91%)

>gb|AC092850.13| Homo sapiens 12 BAC RP11-346B9 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence, Length = 176733, Score = 46.8 bits (24), Expect = 0.023, Identities = 32/36 (88%)

5 >gb|AC126564.7| Homo sapiens 12 BAC RP11-638F5 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence, Length = 121242, Score = 46.8 bits (24), Expect = 0.023, Identities = 32/36 (88%)

>gb|AC093924.3| Genomic sequence for Mus musculus, clone RP23-239M9, from chromosome 17, complete sequence, Length = 166277, Score = 44.9 bits (23), Expect = 0.086, Identities = 31/35 (88%)

10 >gb|AC060234.11| Homo sapiens chromosome 10 clone RP11-523O18, complete sequence, Length = 170073, Score = 44.9 bits (23), Expect = 0.086, Identities = 31/35 (88%)

>gb|AC084727.14| Homo sapiens chromosome 10 clone RP11-507P23, complete sequence, Length = 188652, Score = 44.9 bits (23), Expect = 0.086, Identities = 31/35 (88%)

#### Beispiel 7

15 Die Fig. 6 zeigt das Alignment von Bolinopsin mit Aequorin (*Aequoria victoria*) auf Nukleinsäureebene.

#### Beispiel 8

Die Fig. 7 zeigt das Alignment von Bolinopsin mit Aequorin (*Aequoria victoria*) auf Aminosäureebene.

#### 20 Beispiel 9

#### **Spektrum des Photoproteins Bolinopsin**

Zur Messung der spektralen Eigenschaften von Bolinopsin wurden *E. coli* BL21(DE3) mit den Plasmiden pTriplEX2-CGFP und pTriplEX2 transformiert. Die Induktion erfolgte durch die Zugabe von 1 mM IPTG und einer Inkubation von 4 Stunden bei 37°C. Anschließend wurden die  
25 Bakterien geerntet und in PBS resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch Ultraschall. Anschließend erfolgte die Messung der Fluoreszenz bzw. Biolumineszenz. Das Maximum der Excitation lag bei 352 nm, der Fluoreszenz bei 452 nm und das der Biolumineszenz bei 468 nm.

Die Fig. 3 zeigt die Excitation von Bolinopsin

Die Fig. 4 zeigt die Fluoreszenz von Bolinopsin

Die Fig. 5 zeigt die Biolumineszenz von Bolinopsin

### Beispiel 10

Zur Identifizierung von Substraten für Bolinopsin wurden 5 µl Lösungen verschiedener Coelenterazinderivate ( $10^{-4}$  M) in Methanol mit jeweils 0, 10, 20 und 40 µl Lysat in einem Gesamtvolumen von 75 µl für 3 Stunden bei 4°C inkubiert und die Lumineszenz nach der Zugabe von 25 µl Calciumchlorid (Endkonzentration 5 mM) gemessen. Die Coelenterazine wurden von Sigma (Deutschland) bezogen. Bolinopsin zeigte mit allen eingesetzten Coelenterazinderivaten Biolumineszenzaktivität. Die höchste Aktivität könnte mit dem nativen Coelenterazin gemessen werden.

- 10 Die Fig. 9 zeigt die Coelenterazin-Derivate als potentielle Substrate für Bolinopsin und eine grafische Darstellung der Lumineszenzmessung für 30 Sekunden bei 8,7 kV im Luminometer (RLU, relative light units).

### **Literatur / Patente**

- US 6,495,355  
 15 US 5,541,309  
 US 5,093,240  
 US-0908909  
 US 6,152,358  
 JP-0176125  
 20 GB-0024357  
 WO03006497  
 WO200168824  
 Alam J, Cook JL. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem.* 1990 Aug 1;188(2):245-54  
 25 Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997); Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs; *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402  
 Cullen Bryan R., Malim Michael H., Secreted placental alkaline phosphatase as a eukaryotic reporter gene. *Methods in Enzymology.* 216:362ff  
 30 Fagan TF, Ohmiya Y, Blinks JR, Inouye S, Tsuji FI. Cloning, expression and sequence analysis of cDNA for the Ca(2+)-binding photoprotein, mitrocomin. *FEBS Lett.* 1993 Nov 1;333(3):301-5

- Hastings, J.W. and Morin, J.G. (1969) Comparative biochemistry of calcium-activated photoproteins from the ctenophore, *Mnemiopsis* and the coelenterates *Aequorea*, *Obelia*, and *Pelagia*. *Biol. Bull.* 137, 402.
- Haddock SH, Rivers TJ, Robison BH. Can coelenterates make coelenterazine? Dietary requirement for luciferin in cnidarian bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Sep 25;98(20):11148-51
- Inouye S, Tsuji FI. (1994) *Aequorea* green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett* 1994 Mar 21;341(2-3):277-80
- Inouye S, Tsuji FI. Cloning and sequence analysis of cDNA for the Ca(2+)-activated photoprotein, clytin. *FEBS Lett.* 1993 Jan 11;315(3):343-6.
- Illarionov BA, Bondar VS, Illarionova VA, Vysotski ES. Sequence of the cDNA encoding the Ca(2+)-activated photoprotein obelin from the hydroid polyp *Obelia longissima*. *Gene.* 1995 Feb 14;153(2):273-4.
- Jones K, Hibbert F, Keenan M. Glowing jellyfish, luminescence and a molecule called coelenterazine. *Trends Biotechnol* 1999 Dec;17(12):477-81
- Johnson, F.H., Shimomura, O., Saiga, Y., Gershman, L.C., Reynolds, G.T., and Waters, J.R. (1962) Quantum efficiency of *Cypridina* luminescence, with a note on that of *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 60, 85-103.
- Morin, J.G. and Hastings, J.W. (1971) Biochemistry of the bioluminescence of colonial hydroids and other coelenterates. *J. Cell. Physiol.* 77, 305-311.
- Phillips GN. Structure and dynamics of green fluorescent protein. *Curr Opin Struct Biol.* 1997 Dec;7(6):821-7
- Shimomura O, Johnson FH. Properties of the bioluminescent protein aequorin. *Biochemistry.* 1969 Oct;8(10):3991-7
- Shimomura O., Bioluminescence in the sea: photoprotein systems. *Symp Soc Exp Biol.* 1985;39:351-72
- Shimomura O. Isolation and properties of various molecular forms of aequorin. *Biochem J.* 1986 Mar 1;234(2):271-7.
- Snowdowne KW, Borle AB. Measurement of cytosolic free calcium in mammalian cells with aequorin. *Am J Physiol.* 1984 Nov;247(5 Pt 1):C396-408.
- Yang Te-Tuan, Sinai Parisa, Kitts Paul A. Kain Seven R., Quantification of gene expression with a secreted alkaline phosphatase reporter system. *Biotechnology.* 1997 23(6) 1110ff

Patentansprüche

1. Nukleinsäuremolekül, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
  - a) Nukleinsäuremolekülen, die ein Polypeptid kodieren, welches die Aminosäuresequenz offenbart durch SEQ ID NO: 2 umfasst;
  - 5 b) Nukleinsäuremolekülen, welche die in SEQ ID NO: 1 dargestellte Sequenz umfassen;
  - c) Nukleinsäuremolekülen, deren komplementärer Strang mit einem Nukleinsäuremolekül aus a) oder b) unter stringenten Bedingungen hybridisiert und welche die biologische Funktion eines Photoproteins aufweisen;
  - 10 d) Nukleinsäuremolekülen, welche sich auf Grund der Degenerierung des genetischen Kodes von den unter c) genannten unterscheiden;
  - e) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 95 % zu SEQ ID NO: 1 zeigen, und welche die biologische Funktion eines Photoproteins aufweisen; und
  - 15 f) Nukleinsäuremolekülen, welche eine Sequenzhomologie von mindestens 65% zu SEQ ID NO: 1 zeigen, und welche die biologische Funktion eines Photoproteins aufweisen.
2. Nukleinsäure nach Anspruch 1, welche einen funktionalen Promotor 5' zur das Photoprotein kodierenden Sequenz enthält.
- 20 3. Rekombinante DNA oder RNA Vektoren, welche Nukleinsäuren nach Anspruch 2 enthalten.
4. Organismen, die einen Vektor gemäß Anspruch 3 enthalten.
5. Oligonukleotide mit mehr als 10 aufeinanderfolgenden Nukleotiden, die identisch oder komplementär zu einer Teilsequenz eines Nukleinsäuremoleküls gemäß Anspruch 1 sind.
- 25 6. Polypeptid, das durch eine Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 1 kodiert ist.
7. Verfahren zur Expression der Photoprotein Polypeptide gemäss Anspruch 6 in Bakterien, eukaryontischen Zellen oder in *in vitro* Expressionssystemen.

8. Verfahren zur Aufreinigung/Isolierung eines Photoprotein Polypeptides gemäss Anspruch 6.
9. Peptide mit mehr als 5 aufeinanderfolgenden Aminosäuren, die immunologisch durch Antikörper gegen das Photoprotein Bolinopsin erkannt werden.
- 5 10. Verwendung einer für ein Photoprotein kodierende Nukleinsäure gemäß den Ansprüchen 1 bis 3 als Marker- oder Reportergen.
11. Verwendung eines Photoproteins gemäß Anspruch 6 als Marker oder Reporter.

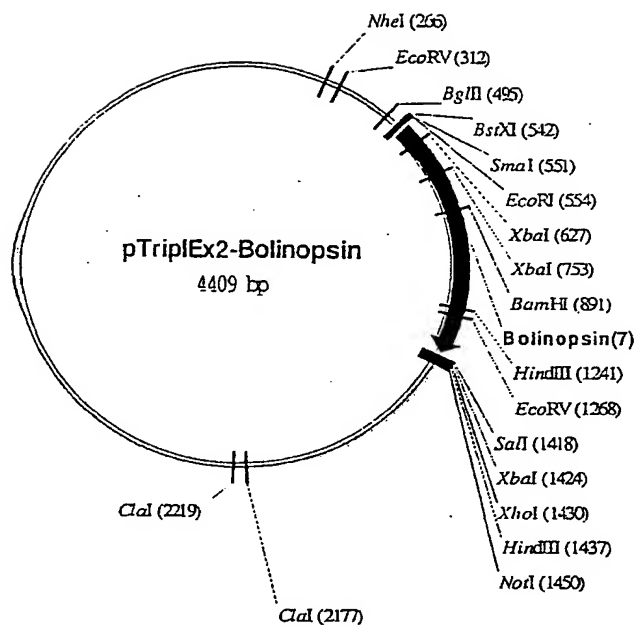
**Fig. 1**

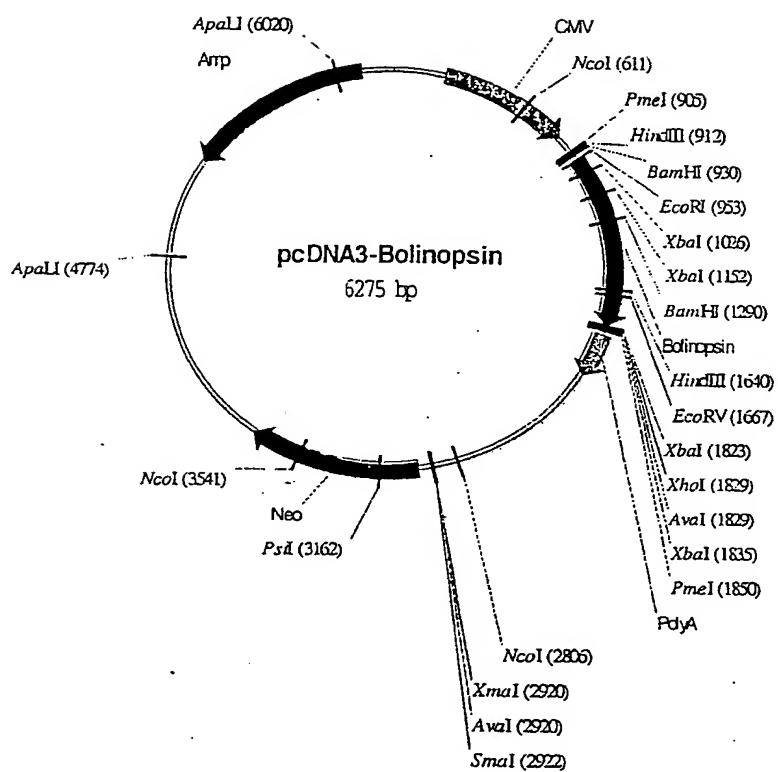
Fig. 2

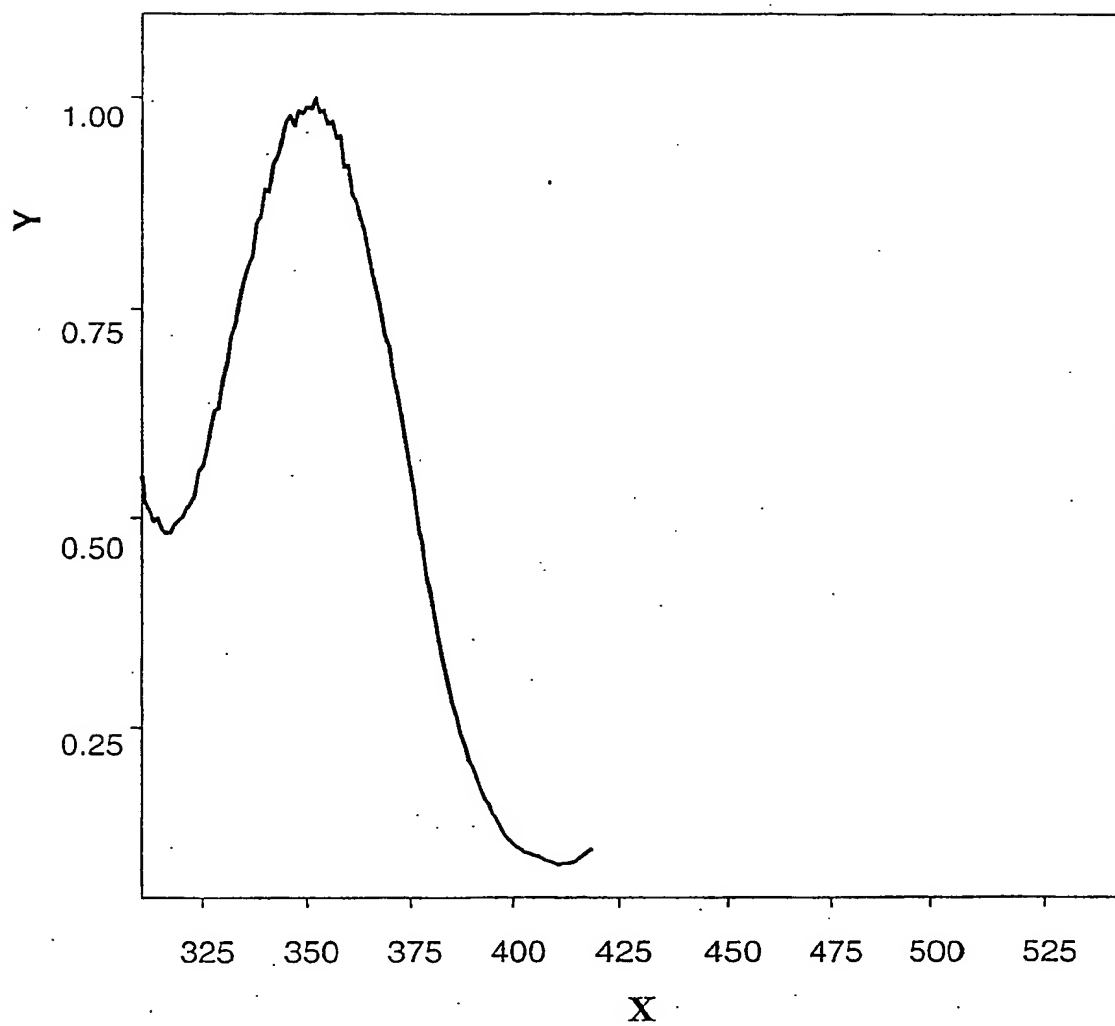
Fig. 3

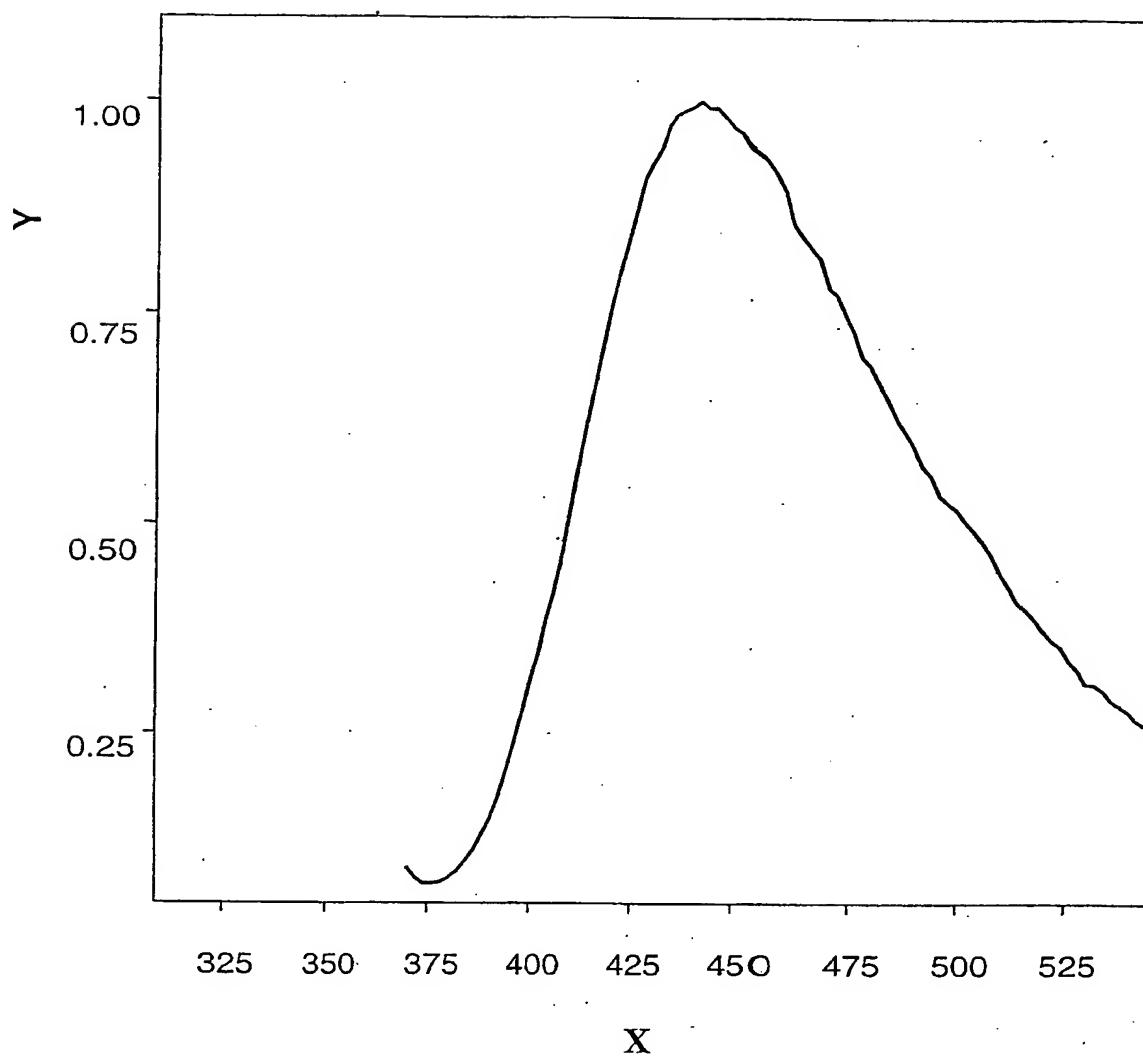
Fig. 4

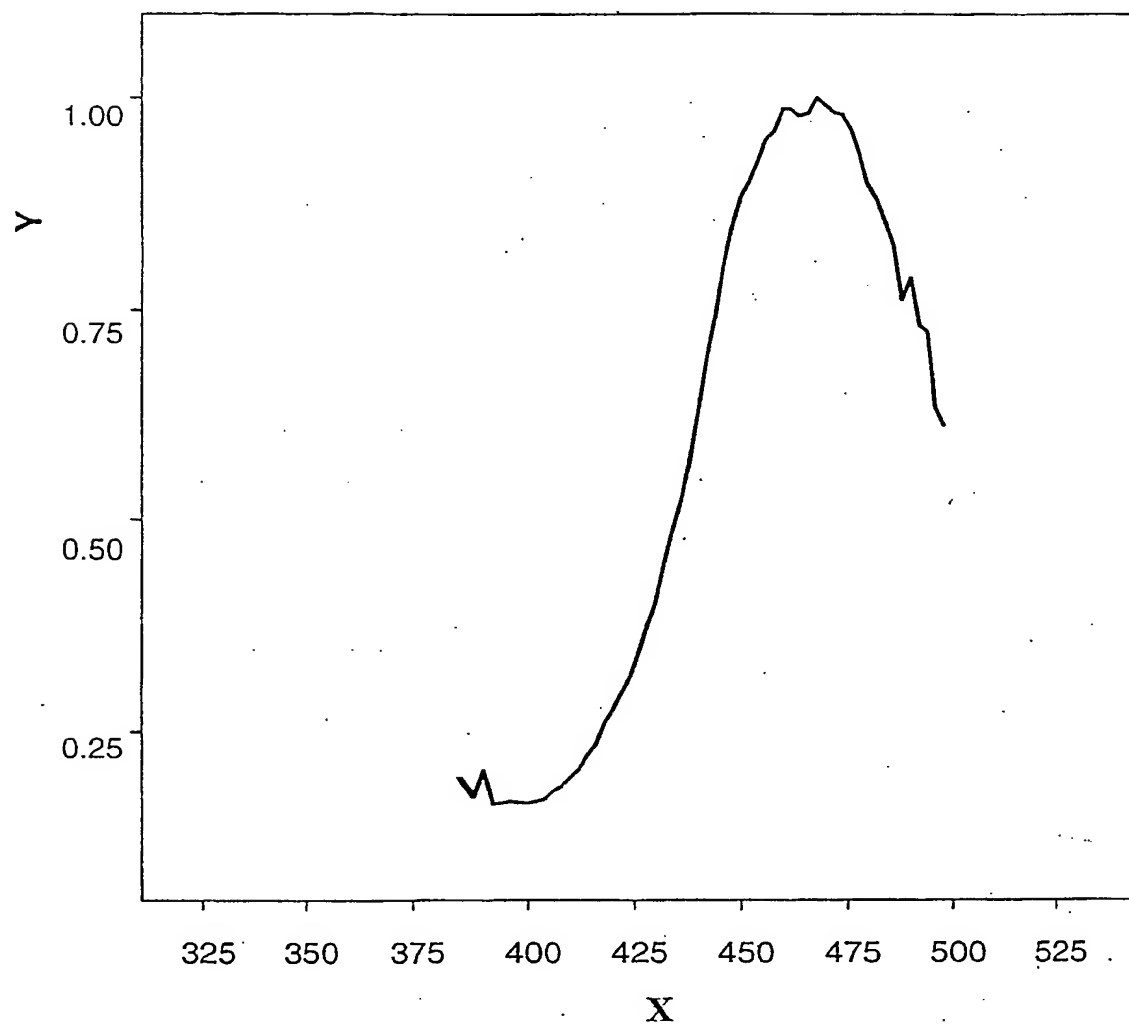
Fig. 5

Fig. 6

```

aequorin _000:ATGACAAGCAAACAATACTCAGTCAAGCTTACATCAGACTTCGACAACCCAAG--ATGGA
score    _000:ATG          C      CTC      TA A AGAC C ACAAC AAG AT GA
bolinopsin_000:ATG-----C-----CTC-----TAGACGAGAC--CAACAACGAAAGCTATAGA

aequorin _060:TTGGACGACACAAGCATATGT-TCAATTTC-----TTGATGTCAACCAC---AAT-GGAAA
score    _060: TGG G A AAG T GT C ATT C TTGATGTC A AC AT AAA
bolinopsin_060:-TGGCTG--AGAAAGTGTGGGTAACGATTGGCAGTTTGATGTCTCGAGGACGTTTCATCCTATAA

aequorin _120:AATCT-----CTCTTGACGAGATGGTCTACA-AGGC-ATCT-GATATTGTC-ATC-AA
score    _120: A CT      CTCT A GAGAT TC ACA C ATCT GA A TG C TC A
bolinopsin_120:CAGCTTAGTCGGCTCTACAAGAGAT--TCGACACCTTCGATCTAGACAGTGACGGTCGTA

```

Fig. 6 Fortsetzung

```

aequorin_180:TAACCTTGAGCAACA-CCTGAGCAAGCCAAACGACACAAGA---TGCTGTAGAAGCCT
score_180:T C TGA C A A CCTG C GCC CGACA AA GA GCTG GAA CT
bolinopsin_180:TGGACATGGA-CGAGATCCTGTACTGGCC---CGACAGAAATGAGGACGCTGGTGAACGCT

aequorin_240:TCTTCGGAGGAGCTGGAATGAAATATGGTGTGGAACCTGATTG----GCCTGCAT--ATA
score_240:TCT GA AG T GA GAA G TG GG CTG TTG CCT C T A A
bolinopsin_240:TCTGACGAACAGGTCGA--GAA----GATGAGG--GCTGCTTGCTACACCTTCTTCCACA

aequorin_300:TTGAAGGA-TGGA--A-A-AAAATTGGCTACT----GATGAAT---TGGAG---AA-----
score_300:AAGGA TGGA A AAAA G CT CT GA GA T T GAG AA
bolinopsin_300:ACAAAGGAGTGGATCCAGAAAGGACTCCTCAGAGACGACTGGGTTGAGGCTAACAGAG

```

Fig. 6 Fortsetzung

```
aequorin_360:-AT-----ACGCCAAAA-----ACGAACCAACG-----CTC-----ATCCGTATAT
score_360:AT A GC AAA A G A C ACG CTC AT GT T T
bolinopsin_360:TATTTGCTGAGGCTGAAAGAGAGAGAGGGAACGACGTGGCATGCCCTCCTTGATTTGGTCTTT

aequorin_420:GGGGTGATGCTTTGTTTGATATCGTTGACAAAGATCAAAATGGAGCCATTACACTGGATG
score_420:G GA GCTT T GAT TC T GA A GA ATGG C TT T GATG
bolinopsin_420:TGTCAGACGCTTACTACGATGTCCTGGATGATGACGGTGATGGTACTGTTGATGTTGATG

aequorin_480:AA-TGGAAGCATACACCAAGCTGCTGGTATCATCCAATCATCAGAAAGATTGGAGGAA
score_480:AA T AAA CAT A AA GCT TG AT CC C CAG AG T G A
bolinopsin_480:AACTCAAAACCAT-GATGAAGGCTTTTG--ATGTGCC--C--CAGGAGGCT--GCCTAC
```

Fig. 6 Fortsetzung

```
aequorin_540:ACATTC---AGAGTGTGC-GATATTGATGAAAGTGGACAACCTCGATGTTGATGAGATGAC
score_540:AC TTC A AG GC GA A GAT A AGTGA AACT GA G GA G GA AC
bolinopsin_540:ACCTTCTTTA-AGAAAGCTGACACGGATAATAGTGGAAAACTGGA-G-AGAAGCGA--AC

aequorin_600:AAGACAACAT---TT-AGGA--TTTTGG-T--ACACCATGGATCCTGCTTGCGAAAAGCT
score_600: G C CAT TT AG A TT TGG T A CC GATCCT TG GA T
bolinopsin_600:TGGTC--CATCTCTTCAGAAAGTTCTGGATGGAATCCTACGATCCTCAGTGGGACGGTGT

aequorin_660:CTACG-GTGGAGCTGTCCCCTAA
score_660:CTACG T A T T TAA
bolinopsin_660:CTACGCTTACAAATAT-----TAA
```

Fig. 7

AEQUORIN \_000:VKLTP-DFDNPkW---IG-----RH-KHM-----FNFLDVNHNGRISLDEMVKYKA  
 score \_000: L | | | W | G H K | | F | D | | GR | DE | | Y |  
 BOLINOPSIN\_000:MPLDETNNESYRWLRSVGNDWQFDVEDVHPKQLSRLYKRFDTFDLSDGRMDMDEILYWP

AEQUORIN \_060:SDIVINNIGATPEQAKRHKDAVEAFFGGAAMKYGVETEWPEYIEGW----KRLASEELKR  
 score \_060: D | | A | EQ | | | | | A | FF | | GV | E | | | W | | A | E | R |  
 BOLINOPSIN\_060:-DRMRQLVNASDEQVEKMRACACTFF----HNKGVDPEKGLLRDDWVEANRVFAEAERER

AEQUORIN \_120:YSKNQITLIRLWGDALFDIIDKDQNGAISLDEWKAYTKSAGIIQSSDCEETFRVCDIDE  
 score \_120: | LI L DA | | D | D D G | | DE K | K | | Q | E | F | D | D  
 BOLINOPSIN\_120:ERRGMPSLIGLLSDAYYDVLDGDDGDTVDVDELKTMKAFDVPQ--EAAYTFFKKADTDN

Fig. 7 Fortsetzung

AEQUORIN \_180:SGQLDVDEMTROHLG--FWY-TMDPACEKLYGGAV----P  
score \_180:SG|L| E| HL FW| |DP |G||  
BOLINOPSIN\_180:SGKLERSEL--VHLFRKFWMESYDP-----QWDGVYAYKY

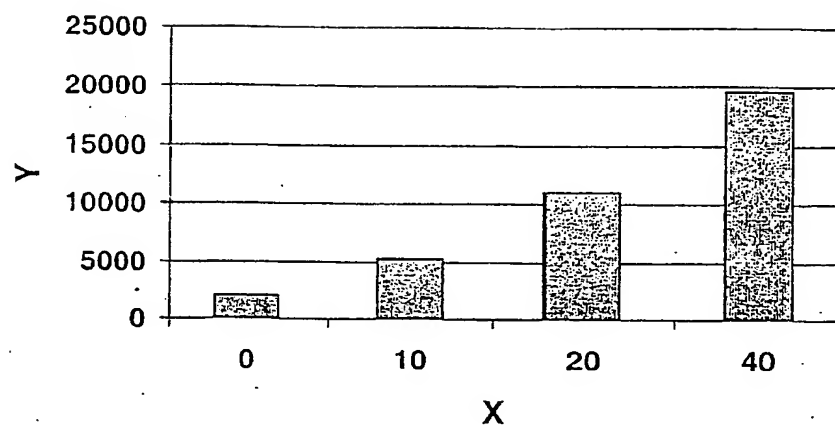
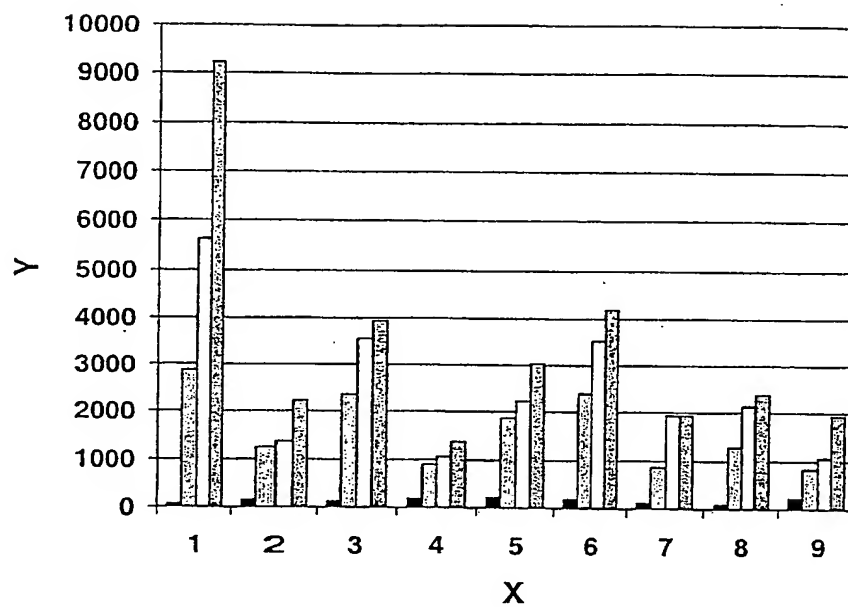
Fig. 8

Fig. 9

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Bayer AG, BHC

&lt;120&gt; Isoliertes Photoprotein Bolinopsin, sowie dessen Verwendung

&lt;130&gt; Le A 36 792

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 621

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bolinopsis infundibulum

&lt;400&gt; 1

atgcctctag	acgagaccaa	caacgaaagc	tatagatggc	tgagaagtgt	gggtaacgat	60
tggcagtttg	atgtcgagga	cggtcaccct	aaacagctta	gtcggctcta	caagagattc	120
gacaccttcg	atctagacag	tgacggctcg	atggacatgg	acgagatcct	gtactggccc	180
gacagaatga	ggcagctggt	gaacgcttct	gacgaacagg	tcgagaagat	gagggctgct	240
tgctacacct	ccttcacaaa	caaaggagtg	gatccagaaa	agggactcct	cagagacgac	300
tgggttgagg	ctaacagagt	atttgctgag	gctgaaagag	agagggaaacg	acgtggcatg	360
ccctccttga	tgggtctttt	gtcagacgct	tactacgatg	tcctggatga	tgacggtgat	420
ggtactgttg	atgttgatga	actcaaaacc	atgatgaagg	cttttgatgt	gccccaggag	480
gctgcctaca	ccttccttaa	gaaagctgac	acggataata	gtggaaaact	ggagagaagc	540
gaactggctc	atctcttcag	aaagttctgg	atggaatcct	acgatcctca	gtgggacggt	600
gtctacgctt	acaaatatta	a				621

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 206

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Bolinopsis infundibulum

&lt;400&gt; 2

Met	Pro	Leu	Asp	Glu	Thr	Asn	Asn	Glu	Ser	Tyr	Arg	Trp	Leu	Arg	Ser
1				5					10					15	
Val	Gly	Asn	Asp	Trp	Gln	Phe	Asp	Val	Glu	Asp	Val	His	Pro	Lys	Gln
			20					25					30		
Leu	Ser	Arg	Leu	Tyr	Lys	Arg	Phe	Asp	Thr	Phe	Asp	Leu	Asp	Ser	Asp
		35					40					45			
Gly	Arg	Met	Asp	Met	Asp	Glu	Ile	Leu	Tyr	Trp	Pro	Asp	Arg	Met	Arg
	50					55					60				
Gln	Leu	Val	Asn	Ala	Ser	Asp	Glu	Gln	Val	Glu	Lys	Met	Arg	Ala	Ala
65					70					75				80	
Cys	Tyr	Thr	Phe	Phe	His	Asn	Lys	Gly	Val	Asp	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu
			85					90						95	
Leu	Arg	Asp	Asp	Trp	Val	Glu	Ala	Asn	Arg	Val	Phe	Ala	Glu	Ala	Glu
			100					105					110		
Arg	Glu	Arg	Glu	Arg	Arg	Gly	Met	Pro	Ser	Leu	Ile	Gly	Leu	Leu	Ser
	115					120						125			
Asp	Ala	Tyr	Tyr	Asp	Val	Leu	Asp	Asp	Asp	Gly	Asp	Gly	Thr	Val	Asp
	130					135					140				
Val	Asp	Glu	Leu	Lys	Thr	Met	Met	Lys	Ala	Phe	Asp	Val	Pro	Gln	Glu
145					150					155				160	
Ala	Ala	Tyr	Thr	Phe	Phe	Lys	Lys	Ala	Asp	Thr	Asp	Asn	Ser	Gly	Lys
				165				170						175	
Leu	Glu	Arg	Ser	Glu	Leu	Val	His	Leu	Phe	Arg	Lys	Phe	Trp	Met	Glu
			180					185					190		
Ser	Tyr	Asp	Pro	Gln	Trp	Asp	Gly	Val	Tyr	Ala	Tyr	Lys	Tyr		
	195						200					205			

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP2004/006608

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K 14/435 C12N5/10 C12N15/12 C12Q1/68 G01N33/50  
G01N33/533

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, EMBL

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE UNIPROT 1 October 1994 (1994-10-01), INOUE S. ET AL.: "Clytin precursor (Phialidin)" XPO02300448 Database accession no. Q08121 the whole document	1-11
X	-& INOUE S ET AL: "CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF CDNA FOR THE CA2+-ACTIVATED PHOTOPROTEIN, CLYTIN" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 315, no. 3, January 1993 (1993-01), pages 343-346, XP001180448 ISSN: 0014-5793 cited in the application the whole document	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 October 2004

Date of mailing of the international search report

28/10/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Huse, I

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/006608

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARKOVA SVETLANA V ET AL: "Obelin from the bioluminescent marine hydroid Obelia geniculata: cloning, expression, and comparison of some properties with those of other Ca <sup>2+</sup> -regulated photoproteins." BIOCHEMISTRY. 19 FEB 2002, vol. 41, no. 7, 19 February 2002 (2002-02-19), pages 2227-2236, XP002232863 ISSN: 0006-2960 the whole document	1-11
X	FAGAN T F ET AL: "Cloning, expression and sequence analysis of cDNA for the Ca(2+)-binding photoprotein, mitrocomin." FEBS LETTERS. 1 NOV 1993, vol. 333, no. 3, 1 November 1993 (1993-11-01), pages 301-305, XP002300183 ISSN: 0014-5793 cited in the application the whole document	1-11
X	INOUE S ET AL: "Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA. MAY 1985, vol. 82, no. 10, May 1985 (1985-05), pages 3154-3158, XP002300184 ISSN: 0027-8424 the whole document	1-6
X	WO 03/006497 A (COURJEAN OLIVIER ARSENE ; LAMBOLEZ BERTRAND (FR); TRICOIRE LUDOVIC ERI) 23 January 2003 (2003-01-23) cited in the application abstract page 8, line 1 - line 10 claims 8,13,15-18	1-11

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/006608

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03006497	A	23-01-2003	FR 2827292 A1	17-01-2003
			CA 2455542 A1	23-01-2003
			EP 1404711 A2	07-04-2004
			WO 03006497 A2	23-01-2003

---

BEST AVAILABLE COPY

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

EP2004/006608

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C07K14/435 C12N5/10 C12N15/12 C12Q1/68 G01N33/50  
G01N33/533

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE, EMBL

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE UNIPROT 1. Oktober 1994 (1994-10-01), INOUE S. ET AL.: "Clytin precursor (Phialidin)" XP002300448 Database accession no. Q08121 das ganze Dokument	1-11
X	-& INOUE S ET AL: "CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF CDNA FOR THE CA2+-ACTIVATED PHOTOPROTEIN, CLYTIN" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 315, Nr. 3, Januar 1993 (1993-01), Seiten 343-346, XP001180448 ISSN: 0014-5793 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-11

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

15. Oktober 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

28/10/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Huse, I

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MARKOVA SVETLANA V ET AL: "Obelin from the bioluminescent marine hydroid Obelia geniculata: cloning, expression, and comparison of some properties with those of other Ca <sup>2+</sup> -regulated photoproteins." BIOCHEMISTRY. 19 FEB 2002, Bd. 41, Nr. 7, 19. Februar 2002 (2002-02-19), Seiten 2227-2236, XP002232863 ISSN: 0006-2960 das ganze Dokument	1-11
X	FAGAN T F ET AL: "Cloning, expression and sequence analysis of cDNA for the Ca(2+)-binding photoprotein, mitrocomin." FEBS LETTERS. 1 NOV 1993, Bd. 333, Nr. 3, 1. November 1993 (1993-11-01), Seiten 301-305, XP002300183 ISSN: 0014-5793 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-11
X	INOUE S ET AL: "Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA. MAY 1985, Bd. 82, Nr. 10, Mai 1985 (1985-05), Seiten 3154-3158, XP002300184 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument	1-6
X	WO 03/006497 A (COURJEAN OLIVIER ARSENE ; LAMBOLEZ BERTRAND (FR); TRICOIRE LUDOVIC ERI) 23. Januar 2003 (2003-01-23) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 8, Zeile 1 - Zeile 10 Ansprüche 8,13,15-18	1-11

BEST AVAILABLE COPY

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen

PCT/EP 2004/006608

## Feld Nr. I Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz(en) (Fortsetzung von Punkt 1 b) auf Blatt 1)

1. Hinsichtlich der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz, die in der internationalen Anmeldung offenbart wurde und für die beanspruchte Erfindung erforderlich ist, ist die internationale Recherche auf folgender Grundlage durchgeführt worden:

a. Art des Materials

☒

Sequenzprotokoll

☐

Tabelle(n) zum Sequenzprotokoll

b. Form des Materials

☒

in schriftlicher Form

☒

in computerlesbarer Form

c. Zeitpunkt der Einreichung

☒

in der eingereichten internationalen Anmeldung enthalten

☒

zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht

☐

bei der Behörde nachträglich für die Zwecke der Recherche eingereicht

2. ☐

Wurden mehr als eine Version oder Kopie eines Sequenzprotokolls und/oder einer dazugehörigen Tabelle eingereicht, so sind zusätzlich die erforderlichen Erklärungen, daß die Information in den nachgereichten oder zusätzlichen Kopien mit der Information in der Anmeldung in der eingereichten Fassung übereinstimmt bzw. nicht über sie hinausgeht, vorgelegt worden.

3. Zusätzliche Bemerkungen:

BEST AVAILABLE COPY

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/006608

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 03006497 A	23-01-2003	FR 2827292 A1	17-01-2003
		CA 2455542 A1	23-01-2003
		EP 1404711 A2	07-04-2004
		WO 03006497 A2	23-01-2003

BEST AVAILABLE COPY